



6680

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 4 C12N 9/02, 15/00	A1	(11) 国際公開番号 WO 90/01542  (43) 国際公開日 1990年2月22日 (22.02.90)
(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00611 (22) 国際出願日 1989年8月9日 (09. 08. 89) (30) 優先権データ 特願昭 63-199295 1988年8月9日 (09. 08. 88) JP 特願昭 63-204173 1988年8月17日 (17. 08. 88) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋富町2丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 風見 潤 (KAZAMI, Jun) [JP/JP] 〒248 神奈川県鎌倉市津西2丁目1-20 Kanagawa, (JP) 中村春次 (NAKAMURA, Haruji) [JP/JP] 〒254 神奈川県平塚市宮松町11-27 Kanagawa, (JP) 後藤俊夫 (GOTO, Toshio) [JP/JP] 〒454 愛知県名古屋市中川区八熊1丁目3-9 Aichi, (JP)		(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: LUCIFERASE, LUCIFERASE-CODING GENE, AND PROCESS FOR PREPARING LUCIFERASE (54) 発明の名称 ルシフェラーゼ、それをコードする遺伝子およびルシフェラーゼの生産方法 (57) Abstract <p>Luciferase having the amino acid sequence of Fig. 1 and a gene coding it are disclosed. In addition, a recombinant vector DNA wherein the luciferase-coding gene is connected to the downstream portion of a promoter capable of expressing in each host cell, a transformant obtained by transforming each host cell by the vector DNA, and a process for preparing luciferase using such transformants are also disclosed.</p> <pre> Met Lys Leu Ile Ile Leu Ser Ile Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Val Asn Cys Gln Asp ATG AAG CTA ATA ATT CTG TCT ATT ATA TTG GCC TAC TGT GTC ACA GTC AAC TGC CAG GAT 10 20 30 40 50 60  Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Ala Pro Ser Ser Thr Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu GCA TGT CCT GTA GAA GCT GCA CCG TCA AGT ACA CCA ACA GTC GCA ACA TCT TGT GAA 70 80 90 100 110 120  Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser GCT AAA GAA GGA GAA TGT ATC GAT ACC AGA TGC GCA ACA TGT AAA CGA GAC ATA CTA TCA 130 140 150 160 170 180  Asp Gly Leu Cys Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile GAC GGA CTG TGT GAA AAT AAA/CCA GGG AAG ACA TGC TGT AGA ATG TGC CAG TAT GTA ATT 190 200 210 220 230 240  Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys Arg Phe Asn Phe GAA TGC AGA GTA GAA GCT GCT GGA TAT TTT AGA ACG TTT TAC GGC AAA AGA TTT AAT TTT 250 260 270 280 290 300  Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr Lys Gly Gly Asp Trp Ser Val Thr CAG GAA CCT GGT AAA TAT GTG CTS GCT CGA GGA ACC AAG GGT GGC GAC TGG TCT GTA ACC 310 320 330 340 350 360  Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly Gln Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu CTC ACC ATG GAG AAT CTA GAT GGA CAG AAG CGA GCT GTA CTG ACT AAG ACA ACA CTG GAG 370 380 390 400 410 420  Val Val Gly Asp Val Ile Asp Ile Thr Glu Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly GTA GTA GGA GAC GTA ATA GAC ATT ACT CAA GCT ACT GCA GAT CCT ATC ACA GTT AAC GGA 430 440 450 460 470 480 </pre>		

(57) 要約

本発明は、第1図のアミノ酸配列を有するルシフェラーゼ及びそれをコードする遺伝子を提供するものであり、さらに、本発明は各宿主細胞中で発現可能なプロモーターの下流に前記ルシフェラーゼをコードする遺伝子を連結してなる組換え体ベクターDNA、そのベクターDNAにより各宿主細胞を形質転換してなる形質転換体、及びそれらの形質転換体を用いたルシフェラーゼの生産方法を提供するものである。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	MG	マダガスカル
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	ML	マリ
BE	ベルギー	FR	フランス	MR	モーリタニア
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	MW	マラウイ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NL	オランダ
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	NO	ノルウェー
BR	ブラジル	IT	イタリア	RO	ルーマニア
CA	カナダ	JP	日本	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KR	大韓民国	SN	セネガル
CH	スイス	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソビエト連邦
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TD	チャード
DE	ドイツ	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
DK	デンマーク	MC	モナコ	US	米国

## 明 細 書

ルシフェラーゼ、それをコードする遺伝子およびルシフェラーゼの生産方法

## 技 術 分 野

- 5      本発明は、生物発光反応を用いた分析法に有効な純化された酵素ルシフェラーゼ及びそれをコードする遺伝子に関する。さらに本発明は、前記遺伝子が挿入された新規組換え体ベクターDNA、該ベクターDNAを有する形質転換体、及び該形質転換体を用いたルシフェラーゼの生産方法を提供する。
- 10

## 背 景 技 術

- ウミホタル (*Cypridina hilgendorffii*) は、日本沿岸に生息する海産甲殻類で、刺激を受けて海水中に青白い発光液を放出する。発光は基質であるルシフェリンを酵素であるルシフェラーゼにより酸化することによって起こり、ホタルや発光バクテリアの発光のように他の必須成分を必要としない非常に単純な発光系であり、微量分析法への利用が期待される。
- 15

- しかしながら、一般にルシフェリンは化学的に合成することによって大量に得ることができるが、ルシフェラーゼは酵素であるため化学合成ができず、大量に得ることは困難である。ウミホタルのルシフェラーゼの場合も同様で、十分に純化されたルシフェラーゼは得られておらず、海洋汚染の進行でウミホタル自身の採集量が激減したと相まって、量的な供給が保証されていない。
- 20
- 25

それ故に、遺伝子組換え技術を利用した該酵素の大量生産法の確立が期待されてきた。

5 本発明は、高度に純化されたルシフェラーゼの化学合成法、もしくは遺伝子組換え法による合成を可能ならしめ、高純度の該蛋白質を大量に得るために、該蛋白質を特定する遺伝子配列を得、クローニングされた遺伝子配列を動物細胞、酵母、大腸菌等で発現することを可能にし、それらの細胞を用いて、高純度の該酵素を大量に得ることを目的とする。

## 10 発 明 の 開 示

本発明は第1図のアミノ酸配列を有するルシフェラーゼ、及びそれをコードする遺伝子、該遺伝子を含んでなる新規組換え体ベクターDNA、及び該ベクターDNAにより宿主細胞を形質転換してなる形質転換体、及び該  
15 形質転換体を用いたルシフェラーゼの生産方法である。

### 図面の簡単な説明

第1a図、第1b図、第1c図、第1d図は、ウミホタル由来のルシフェラーゼのcDNAの塩基配列及びアミノ酸配列を示す。各列の上段は、アミノ酸配列を示す。  
20 各列の下段はcDNAの塩基配列を示す。

第2図は、ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードするcDNAを含む組換え体プラスミドpCL07の作製法と、その制限酵素地図を示す。

第3図は、動物細胞におけるウミホタル由来のルシフェラーゼの発現ベクターpSVLCL5の作製法を示し  
25

たものである。

第4a図は、酵母におけるウミホタル由来のルシフェラーゼの発現ベクターpMFE3A、pMFE3B、pMFE3C、pMFE3Dの制限酵素地図、第4b図は、各々の発現ベクターにおける $\alpha$ フェロモン遺伝子／ルシフェラーゼcDNAの接続部位近傍の塩基配列、及びアミノ酸配列を示したものである。

第5図は、酵母におけるウミホタル由来のルシフェラーゼの発現ベクターpGL1の作製方法を示したものである。

第6図は、大腸菌におけるウミホタル由来のルシフェラーゼの発現ベクターpMT-CLP、pMT-CLS、pMT-CLTの作製方法を示したものである。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明のルシフェラーゼは、第1図に示される1番目から555番目までの555個のアミノ酸配列からなる蛋白質、または、第1図に示されるアミノ酸配列のうち、29番目のアミノ酸であるプロリンから始まる527個のアミノ酸配列からなる蛋白質、30番目のアミノ酸であるセリンから始まる526個のアミノ酸配列からなる蛋白質、31番目のアミノ酸であるセリンから始まる525個のアミノ酸配列からなる蛋白質、もしくは32番目のスレオニンから始まる524個のアミノ酸配列からなる蛋白質である。さらに、本発明のルシフェラーゼは前記ルシフェラーゼと実質的に同等のルシフェラーゼ活

性が保持されているならば、前記アミノ酸配列の置換、欠失、挿入等から構成される蛋白質、すなわちルシフェラーゼ同効物も本発明に含まれる。

5 本発明の遺伝子は、上記ルシフェラーゼをコードする遺伝子であって、第1図の下段にDNA塩基配列で示したものであるが、実質的に同等のルシフェラーゼ活性が保持されているならば、塩基配列の置換、欠失、挿入等から構成される塩基配列も本発明に含まれる。

10 本発明のルシフェラーゼをコードする遺伝子を得る方法を説明する。まず、ウミホタルをグアニジンチオシアネート中で破碎した破碎液から全RNAを抽出し、オリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーによりポリA<sup>+</sup> RNAを精製する。このポリA<sup>+</sup> RNAを出発材料としてcDNAを合成後、λgt10にクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。

15 一方、ウミホタルより精製したルシフェラーゼ蛋白質のN末端近傍のアミノ酸配列、及びリジルエンドペプチダーゼ分解によって得られたオリゴペプチドのアミノ酸配列を決定し、それらに対応するヌクレオチド配列を有する数種類のオリゴヌクレオチドを化学合成し、上述のcDNAライブラリーのスクリーニングのためのプローブとして用いる。

20 プラークハイブリダイゼーション法によりこれらのプローブがハイブリッドを形成する組換え体の有する挿入遺伝子の塩基配列の解析を行い、ルシフェラーゼ蛋白質

25

のアミノ酸配列と一致すれば、ルシフェラーゼ・タンパクをコードする遺伝子の一部であると同定できる。

さらに、本発明は動物細胞、酵母、大腸菌に代表される宿主細胞中で各々発現可能なプロモーターの下流に各々上記DNAを連結してなる組換えベクターDNA、そのベクターDNAにより宿主細胞を形質転換してなる形質転換体、及びそれらの形質転換体を用いたルシフェラーゼの生産方法を提供するものである。

具体的には、上述のようにして得られたウミホタル由来のルシフェラーゼをコードするcDNAを、動物細胞、酵母、大腸菌中において各々安定に保持され、かつそれらの細胞中において発現可能なプロモーターを持つベクターDNAに連結し、本発明の組換え体ベクターDNAが得られる。

ここで、プロモーターとは、RNA合成酵素が認識結合してRNA合成を開始するための信号であり、その下流に位置するDNA配列がmRNAに転写される。したがって、ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子がmRNAに転写されるためには、各々の細胞中で機能するプロモーターの下流に、ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子が位置する必要がある。

すなわち、ベクターDNAに含まれるプロモーターの下流の適当な位置にその認識配列の存在する適当な制限酵素によりベクターDNAを切断し、上記のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含むDNAを連結、挿入した

ものが用いられる。

ここで使用するプロモーターは、各々の宿主細胞中で機能するものなら何でも良く、例えば動物細胞においては動物細胞遺伝子もしくは動物ウイルス遺伝子のプロモーター等があげられる。より具体的には、SV40の後期プロモーター、チミジンキナーゼ遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、サイトメガロウイルス遺伝子のプロモーター等があげられる。酵母においては、酵母遺伝子のプロモーター等が用いられる。例えば、酵母の抑制性酸性フォスファターゼ遺伝子(PHO5)、ガラクトース代謝酵素遺伝子(GAL1)、 $\alpha$ フェロモン遺伝子(MF $\alpha$ 1)のプロモーター等が用いられる。大腸菌においては、大腸菌遺伝子、ファージ遺伝子のプロモーター等が用いられる。例えば、大腸菌ラクトース分解酵素の遺伝子(lac)のプロモーター、trpオペロンに由来するプロモーター、 $\lambda$ ファージのP<sub>L</sub>プロモーター等があげられる。また、合成tacプロモーターなども使用できる。

本発明で用いるベクターDNAは、各々の細胞中で安定に保持され、その細胞中で機能するプロモーターを持つものなら何でも良い。例えば、動物細胞では、プラスミドベクター、ウイルスベクター等があげられるが、より具体的には、pSV2[SV40の初期プロモーターを持つ: J. Mol. Appl. Genet. USA, 1, 327(1982)]、pSVL(SV40の後期



プロモーターを持つ：ファルマシア社製）、等があげられる。酵母においては、pMF $\alpha$ 8 [ $\alpha$ フェロモン遺伝子 (MF $\alpha$ 1) のプロモーターを持つ：Gene、3、155 (1985)]、pAM85 [抑制性酸性フォスファターゼ遺伝子 (PHO5) のプロモーターを持つ：Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80、1 (1983)] 等があげられる。大腸菌においては、pMT-1 [*trp* オペロンのプロモーターを持つ発現ベクター pKM6 (特開昭61-247387号) 由来]、pUC18/pUC19 [Gene、33、103 (1985)] 等があげられる。

宿主細胞において機能する蛋白質分泌のためのシグナル配列をコードする塩基配列の下流に、ルシフェラーゼをコードするcDNAをつなぐことで、ルシフェラーゼを細胞外に生産させることができる。このシグナル配列に特に制限はなく、動物細胞においては、例えば、インターロイキン-2 (IL-2) のシグナル配列等があげられる。酵母においては、 $\alpha$ フェロモンのシグナル配列等があげられる。大腸菌の場合は、 $\beta$ -ラクタマーゼのシグナル配列等があげられる。細胞内に生産させる場合は、シグナル配列を連結する必要はない。

宿主細胞として大腸菌を用い、細胞内にルシフェラーゼを生産させる場合には、発現させたい遺伝子がコードされる領域の5'末端にメチオニンをコードする塩基配列である“ATG”を付加し、大腸菌中で機

能するプロモーター及びS D配列の下流に連結する必要がある。ここでいうS D配列とは、リボソームがm R N A上の同配列を認識、結合して、その下流にある“ A T G ”よりタンパク合成を開始するための信号である。また、メチオニンを付加するのは、分泌タンパクをコードしている真核生物の遺伝子の多くは、分泌のためのシグナル配列の下流に本来のタンパクをコードしており、まずシグナル配列を含む形でポリペプチドの前駆体を合成し、このタンパクが分泌される過程でシグナル配列が切断除去されるため、最終的に生産されるタンパクのN末端にはタンパク合成の開始信号として必須であるメチオニンの信号が付いていない場合が多いためである。また、ウミホタルより精製した天然型のルシフェラーゼがセリン及びスレオニンの2種類のN末端を持つタンパクの混合物であること、また、多くの真核生物ではシグナル配列はアラニン-X-アラニン配列の次で切断され、ウミホタル・ルシフェラーゼの塩基配列より予想されるアミノ酸配列中にアラニン-グルタミン酸-アラニン-プロリンという配列が存在することから、本発明のベクターはN末端領域に関して、メチオニンの下流にプロリン、セリン、またはスレオニンから始まるペプチドをコードする3種類の発現ベクターが用いられる。

前記各々の組換え体ベクターDNAにより動物細胞、酵母、大腸菌に代表される宿主細胞を各々形質転換した形質転換体とは、前記組換え体ベクターDNAを各々の

宿主細胞に導入することによって得られる。

本発明で使用する動物細胞としては特に制限はなく、例えば、COS-1細胞（アフリカミドリザル腎臓由来SV40形質転換細胞）、CHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣由来）等があげられ、好ましくはCOS-1細胞が用いられる。本発明において使用される酵母としては特に制限はなく、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Shizosaccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*等があげられる。本発明において使用される大腸菌に特に制限はなく、例えば、HB101、JM109等があげられる。

組換え体ベクターDNAを宿主細胞中に導入する方法に特に制限はないが、例えば、宿主細胞が動物細胞の場合は、DEAE-デキストラン法[Mol. Cell. Biol.、5、1188(1985)]、カルシウム-リン酸共沈法[Cell、14、725(1978)]、電気穿孔法[EMBO J.、1、841(1982)]等があげられる。中でも、DEAE-デキストラン法が好ましく用いられる。宿主細胞が酵母の場合は、プロトプラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA、75、1929(1978)]が好ましく用いられる。また、宿主細胞が大腸菌の場合は、好ましくは塩化カルシウム法[J. Mol. Biol.、53、154(1970)]が用いられる。

このようにして組換え体ベクターDNAを動物細胞、

- 酵母、大腸菌に代表される宿主細胞中に各々導入することにより、ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含むDNAをベクターDNAに挿入した新規な組換え体ベクターDNA、さらにルシフェラーゼ生産能を有する形質転換体を得ることができる。

- 上記形質転換体を各々培地に培養し、培養物よりルシフェラーゼを得ることができる。培地としては、各々の培養に用いられるものであれば何でも良く、例えば、動物細胞の場合はダルベッコ変法イーグル培地等があげられ、酵母ではYEPD培地（20g/l トリプトン/10g/l 酵母エキス/20g/ml グルコース）等があげられ、大腸菌ではL培地（10g/l トリプトン/5g/l 酵母エキス/10g/l 塩化ナトリウム）等があげられる。

- 培養温度は各々の細胞が生育できる温度であれば何でも良いが、例えば15～45℃が好ましく、さらに好ましくは動物細胞、大腸菌では25～40℃、より好ましくは30～37℃である。酵母では15～40℃、より好ましくは20～30℃である。培養時間にも特に制限はないが、通常1～10日間、好ましくは動物細胞、酵母では3～7日間、大腸菌では1～3日間である。

- プロモーターがその発現に適当な誘導を必要とする場合、例えば、動物細胞におけるメタロチオネイン遺伝子のプロモーター、酵母における抑制性酸性フォスファターゼ遺伝子のプロモーター、大腸菌における *trp* プ

ロモーター等を用いる場合では適当な誘導物質を加える、適当な物質を除く、培養温度を変化させる、紫外線等を照射する等、各々のプロモーターに応じた手段により、培養中にプロモーターの発現に誘導をかけることができる。具体的には、大腸菌において *trp* プロモーターを使用した場合、*trp* オペロンの誘導物質である I A A (インドールアクリル酸) を培地に添加することにより、プロモーターの発現を誘導できる。

この際に、非誘導条件下で産生される微量のタンパクの存在が細胞の増殖等に悪影響を与える場合には、非誘導下ではプロモーターの発現をできるだけ抑制しておくことが好ましい。例えば、非誘導下では完全に発現の抑制されるプロモーターを用いる、プロモーターの抑制遺伝子と組み合わせる等があげられる。具体的には例えば、*trp* プロモーターの場合、*trp* オペロンの抑制遺伝子を同一プラスミド上に持つ組換えプラスミドを用いることが好ましい。この抑制方法としては、トリプトファン リプレッサー遺伝子 (*trpR*) [Nucleic Acids Res., 8, 1552 (1980)] が用いられる。これらとは別に、前述のように、生産されるタンパクを細胞外に分泌させる方法を用いることも可能である。

培養物は、適当な方法、例えば遠心分離等により培養上清と細胞とに分け、その培養上清もしくは細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性をルミノメーター等を用いて検

出する。この培養上清もしくは細胞抽出液はそのままでも粗酵素液として使用可能であるが、必要により、例えばF. I. Tsujiの方法[Methods in Enzymol.、57、364(1978)]記載の方法により精製して、純化されたルシフェラーゼを得る  
5 ことができる。

### 実施例

以下、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明する。

#### 実施例1

##### 10 cDNAライブラリーの作製

千葉県館山湾内で採集後、凍結保存したウミホタル5gを6M グアニジン チオシアネート/5mM クエン酸ナトリウム(pH 7.0)/0.5% ザルコシン酸ナトリウム溶液75mlに懸濁し、ポリトロンホモジナイザー(キネマティカ社製)で破碎した。塩化リチウム溶液(アマシャム社製キット)を加え、塩化リチウム共沈法によって約600 $\mu$ gのRNAを得た。このうち300 $\mu$ gのRNAをオリゴ(dT)セルローカラム(コラボレイティブ リサーチ社製)クロマトグラフィーによって精製し、約15 $\mu$ gのポリ(A)+RNAを得た。このうち2 $\mu$ gからcDNA合成キット(ライフ テクノロジーズ社製)を用いて1 $\mu$ gの2本鎖DNAを得た。このうちの0.15 $\mu$ gをEcoRI メチラーゼで処理してEcoRI切断部位を保護し、T4 DNA リ  
15  
20  
25 ガーゼを用いてEcoRI リンカーを結合した。さら

に、EcoRIで処理し、両末端をEcoRI切断部位に変換した。このDNAをT4 DNA リガーゼを使ってλgt10のEcoRI部位に挿入した後、in vitro パッケージングによりファージ パーティクル中に導入した。これを大腸菌NM514に形質導入し、 $1 \times 10^6$  PFUのcDNAライブラリーを得た。

## 実施例2

### オリゴヌクレオチド・プローブの作製

F. I. Tsujiの方法[Methods in Enzymol., 57, 364 (1978)]で精製したウミホタル・ルシフェラーゼ100 μgを凍結乾燥した後、100 μlの8M 尿素/0.1M トリス塩酸(pH 7.6)/0.14M 2-メルカプトエタノールに溶解して、37°Cで3時間保温して-SH基をピリジルエチル化した。これに200 μlの0.11M トリス塩酸(pH 9.0)、1 μlの2-メチルメルカプトエタノール、1 μlの2 μg/μl リジルエンドペプチダーゼ(和光純薬社製)を加えて、37°Cで1時間消化した。これをVYDAC 218 TP54 (C<sub>18</sub>) (VYDAC社製)のHPLCにかけ、オリゴペプチドを分離した。得られたオリゴペプチドのうち13個について、アミノ酸シーケンサー470A (アプライド バイオシステムズ社製)を用いてN末端のアミノ酸配列を解析したところ、以下の13個のアミノ酸配列を得た。

14

## フラグメント 7 - 1

1 5 10

Thr-Cys-Gly-Ile-Cys-Gly-Asn-Tyr-Asn-Gln

5

## フラグメント 7 - 2

1 5 10

Glu-Gly-Glu-Cys-Ile-Asp-Thr-Arg-Cys-Ala-

11 13

10

Thr-Cys-Lys

## フラグメント 1 2 - 1

1 5 10

Cys-Asn-Val-Cys-Tyr-Lys-Pro-Asp-Arg-Ile-

15

11

Ala

## フラグメント 1 2 - 2

20

1 5 7

Val-Ser-His-Arg-Asp-( )-Glu

25



15

## フラグメント 1 3

1 5 10

Ala-Arg-Tyr-Gln-Phe-Gln-Gly-Pro-Met-Lys  
(Cys)

5

## フラグメント 1 8

1 5 9

Arg-Phe-Asn-Phe-Gln-Glu-Pro-Gly-Lys

10

## フラグメント 2 1

1 5 10

Arg-Asp-Ile-Leu-Ser-Asp-Gly-Leu-Cys-Glu-

11 15

15

Asn-Lys-Pro-Gly-Lys

## フラグメント 2 3

1 5 10

Gly-Gln-Gln-Gly-Phe-Cys-Asp-His-Ala-Trp-

20

11 13

Glu-Phe-Lys

25

16

## フラグメント 2 7

1 5 10  
Glu-Phe-Asp-Gly-Cys-Pro-Phe-Tyr-Gly-Asn-

5 11 15 18  
Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Tyr-Cys-Lys

## フラグメント 3 8

1 5 10  
10 Gly-Gly-Asp-( )-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Met-

11 15 17  
Glu-Asn-Leu-Asp-Gly-Gln-Lys

## 15 フラグメント 4 0

1 5 10  
His-Val-Leu-Phe-Asp-Tyr-Val-Glu-Thr-Cys-

11 15 20  
20 Ala-Ala-Pro-Glu-Thr-Arg-Gly-Thr-Cys-Val-

21 25 30  
Leu-Ser-Gly-His-Thr-Phe-Tyr-Asp-Thr-Phe

25

17

## フラグメント 47

1                      5                      10  
Glu-Leu-Leu-Met-Ala-Ala-Asp-Cys-Tyr-( )-

5                    11                    15    16  
Asn-Thr-( )-Asp-Val-Lys

フラグメント 50

10 ( )-Leu-Met-Glu-Pro-Tyr-Arg-Ala-Val-Cys-

[illegible]

15 次に上記の13種のアミノ酸配列のうち下記の5種に対するオリゴヌクレオチドをDNA合成装置（アプライド バイオシステムズ社製）を用いて作製した。なお塩基配列中のIは、デオキシイノシンを示す。

20

25

18

プローブ I (フラグメント 27 の 1 ~ 6 番のアミノ酸配列に対応)

Glu-Phe-Asp-Gly-Cys-Pro

GAA TTT GAT GGT TGT CCT

5            G    C    C    C    C    C  
                                 A            A  
                                 G            G

10

3'-CTT AAA CTA CCI ACA GG-5'

C    G    G            G

プローブ II (フラグメント 23 の 6 ~ 10 番のアミノ酸配列に対応)

15

Cys-Asp-His-Ala-Trp

TGT GAT CAT GCT TGG

20

C    C    C    C

A

G

3'-ACA CTA GTA CGI ACC-5'

G    G    G

25

19

プローブⅢ（フラグメント 47 の 4～9 番のアミノ酸  
配列に対応）

Met-Ala-Ala-Asp-Cys-Tyr

ATG GCT GCT GAT TGT TAT

5                    C    C    C    C    C  
                  A    A  
                  G    G

10

3'-TAC CGI CGI CTA ACA AT-5'

G    G

プローブⅣ（フラグメント 50 の 3～7 番のアミノ酸  
配列に対応）

15            Met-Glu-Pro-Tyr-Arg

ATG GAA CCT TAT CGT

                  G    C    C    C  
                  A            A  
                  G            G  
20                            AGA  
                              G

25

3'-TAC CTT GGI ATA TC-5'

C            G G

プローブ V (フラグメント 13 の 1 ~ 10 番のアミノ酸配列に対応)

	Ala-Arg-Tyr-Gln-Phe-Gln-Gly-Pro-Met-Lys									
5	GCT	CGT	TAT	CAA	TTT	CAA	GGT	CCT	ATG	AAA
	C	C	C	G	C	G	C	C		G
	A	A					A	A		
	G	G					G	G		
			AGA							
10			G							

3'-CGI GCI ATA GTT AAA GTT CCI GGI TAC TTT-5'
T G C G C

15

以上の 5 種のオリゴヌクレオチド各々 1  $\mu$ g を、10  $\mu$ l の 50 mM トリス塩酸 (pH 7.6) / 10 mM 塩化マグネシウム / 5 mM ジチオスレイトール / 1 mM スペルミジン / 100 mM 塩化カリウム に溶解し、5  $\mu$ l の [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (3000 Ci/mmol; アマシャム社製)、85  $\mu$ l の蒸留水、2  $\mu$ l の T4 ポリヌクレオチド キナーゼ (宝酒造社製) を添加して、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応して  $^{32}$ P 標識した。

25

## 実施例 3

ブランクハイブリダイゼーション法による cDNA ライブラリーのスクリーニング

実施例 1 で作製した cDNA ライブラリーを用いて、  
5 50 枚の寒天プレートに 1 枚当たり約 1 万個のブランク  
を出現させた。このブランクをナイロン・メンブレンに  
移し取り、0.5 M 水酸化ナトリウム / 1.5 M 塩  
化ナトリウム溶液中で DNA を変性させた後、0.5 M  
トリス塩酸 (pH 7.0) / 1.5 M 塩化ナトリウム溶液中  
10 で中和した。このメンブランを 80 °C で 2 時間保温して、  
ファージ DNA をメンブラン上に固定した後、50 mM  
リン酸ナトリウム (pH 7.4) / 0.75 M 塩化ナトリウム  
/ 5 × デンハルト溶液 (0.1 % 牛血清アルブミン  
/ 0.1 % フィコール / 0.1 % ポリビニルピロリ  
15 ドン) / 5 mM EDTA / 0.1 % SDS / 100  
μg / ml 変性サケ精子 DNA 溶液中で 45 °C で 2 時  
間保温してプレハイブリダイゼーションを行った。

次に、新たな同溶液中にメンブランを移し、5 μCi  
/ ml となるように実施例 2 で標識したオリゴヌクレオ  
チドプローブ V を添加して、45 °C で一夜保温してハイ  
ブリダイゼーションを行った。約 16 時間後、6 × SS  
C [90 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0) / 0.9 M  
塩化ナトリウム] / 0.1 % SDS を用いて室温下で  
30 分間ずつ 2 回、次に 45 °C で 30 分間ずつ 2 回メン  
25 ブランの洗浄を行った。このメンブランを風乾した後、

X-OMAT<sup>TM</sup>ARフィルム（コダック社製）を用いて、  
-70℃、48時間オートラジオグラフィを行った。

フィルムを現像し、32個の陽性クローンを得た。寒  
天プレート上のこれらの陽性クローンよりファージを増  
殖させ、ファージDNAを精製した。DNAは-20℃  
で保存した。

#### 実施例4

##### ルシフェラーゼ蛋白質と遺伝子の1次構造の比較

実施例3で得られた32個の陽性クローンのうち、最  
大の約1900塩基対の挿入断片を含むクローンλCL  
07より挿入断片を制限酵素EcoRIで切り出し、プ  
ラスミドpUC18にサブクローニングし、組換え体プ  
ラスミドpCL07を作製した（第2図）。この1.9  
kbのEcoRI断片の塩基配列の決定は、通常のジデ  
オキシ法を用いて行った。決定された塩基配列を第1図  
に示す。

得られた遺伝子の情報と、実施例2で得られた蛋白質  
の情報とを比較することにより、第1表に示すように蛋  
白質と遺伝子の1次構造を対応させることができた。そ  
の結果、第1図に示すようにウミホタル由来のルシフェ  
ラーゼの遺伝子の塩基配列が特定され、また該蛋白質の  
アミノ酸配列を規定することができた。



第1表. アミノ酸配列と遺伝子の1次構造との対応(その1)

	アミノ酸配列の解析の結果	遺伝子1次構造との対応
	フラグメント7-1 Thr-Cys-Gly-Ile-Cys-Gly-Asn-Tyr-Asn-Gln	Thr-Cys-Gly-Ile-Cys-Gly-Asn-Tyr-Asn-Gln ACA TGC GGC ATA TGT GGT AAC TAT AAT CAA
5	フラグメント7-2 Glu-Gly-Glu-Cys-Ile-Asp-Thr-Arg-Cys-Ala-  Thr-Cys-Lys	Glu-Gly-Glu-Cys-Ile-Asp-Thr-Arg-Cys-Ala- GAA GGA GAA TGT ATC GAT ACC AGA TGC GCA  Thr-Cys-Lys ACA TGT AAA
10	フラグメント12-1 Cys-Asn-Val-Cys-Tyr-Lys-Pro-Asp-Arg-Ile-  Ala	Cys-Asn-Val-Cys-Tyr-Lys-Pro-Asp-Arg-Ile- TGT AAT GTC TGC TAC AAG CCT GAC CGT ATT  Ala GCA
	フラグメント12-2 Val-Ser-His-Arg-Asp-( )-Glu	Val-Ser-His-Arg-Asp-( )-Glu GTT TCA CAT AGA GAT GTT GAG
15	フラグメント13 Ala-Arg-Tyr-Gln-Phe-Gln-Gly-Pro-Met-Lys (Cys)	Ala-Arg-Tyr-Gln-Phe-Gln-Gly-Pro-Met-Lys (Cys) GCC AGA TAT CAA TTC CAG GGC CCA TGC AAA
	フラグメント18 Arg-Phe-Asn-Phe-Gln-Glu-Pro-Gly-Lys	Arg-Phe-Asn-Phe-Gln-Glu-Pro-Gly-Lys AGA TTT AAT TTT CAG GAA CCT GGT AAA
20	フラグメント21 Arg-Asp-Ile-Leu-Ser-Asp-Gly-Leu-Cys-Glu-  Asn-Lys-Pro-Gly-Lys	Arg-Asp-Ile-Leu-Ser-Asp-Gly-Leu-Cys-Glu- CGA GAC ATA CTA TCA GAC GGA CTG TGT GAA  Asn-Lys-Pro-Gly-Lys AAT AAA CCA GGG AAG
	フラグメント23 Gly-Gln-Gln-Gly-Phe-Cys-Asp-His-Ala-Trp-  Glu-Phe-Lys	Gly-Gln-Gln-Gly-Phe-Cys-Asp-His-Ala-Trp- GGA CAG CAA GGA TTC TGT GAC CAT GCT TGG  Glu-Phe-Lys GAG TTC AAA
25		

第1表. アミノ酸配列と遺伝子の1次構造との対応(その2)

	アミノ酸配列の解析の結果	遺伝子1次構造との対応
5	フラグメント27 Glu-Phe-Asp-Gly-Cys-Pro-Phe-Tyr-Gly-Asn-	Glu-Phe-Asp-Gly-Cys-Pro-Phe-Tyr-Gly-Asn- GAG TTC GAC GGC TGC CCA TTC TAC GGG AAT
	Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Tyr-Cys-Lys	Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Tyr-Cys-Lys CCT TCT GAT ATC GAA TAC TGC AAA
10	フラグメント38 Gly-Gly-Asp-( )-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Met-	Gly-Gly-Asp-( )-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Met- GGT GGC GAC TGG TCT GTA ACC CTC ACC ATG
	Glu-Asn-Leu-Asp-Gly-Gln-Lys	Glu-Asn-Leu-Asp-Gly-Gln-Lys GAG AAT CTA GAT GGA CAG AAG
15	フラグメント40 His-Val-Leu-Phe-Asp-Tyr-Val-Glu-Thr-Cys-	His-Val-Leu-Phe-Asp-Tyr-Val-Glu-Thr-Cys- CAC GTC CTT TTC GAC TAT GTT GAG ACA TGC
	Ala-Ala-Pro-Glu-Thr-Arg-Gly-Thr-Cys-Val-	Ala-Ala-Pro-Glu-Thr-Arg-Gly-Thr-Cys-Val- GCT GCA CCG GAA ACG ACA GGA ACG TGT GTT
	Leu-Ser-Gly-His-Thr-Phe-Tyr-Asp-Thr-Phe	Leu-Ser-Gly-His-Thr-Phe-Tyr-Asp-Thr-Phe TTA TCA GGA CAT ACT TTC TAT GAC ACA TTC
20	フラグメント47 Glu-Leu-Leu-Met-Ala-Ala-Asp-Cys-Tyr-( )-	Glu-Leu-Leu-Met-Ala-Ala-Asp-Cys-Tyr-( )- GAG CTT CTG ATG GCC GCA GAC TGT TAC TGG
	Asn-Thr-( )-Asp-Val-Lys	Asn-Thr-( )-Asp-Val-Lys AAC ACA TGG GAT GTA AAG
25	フラグメント50 ( )-Leu-Met-Glu-Pro-Tyr-Arg-Ala-Val-Cys-	( )-Leu-Met-Glu-Pro-Tyr-Arg-Ala-Val-Cys- GGT CTC ATG GAG CCA TAC AGA GCT GTA TGT
	( )-Asn-Asn-Ile-Asn-Phe-Tyr-Tyr-Tyr-Thr	( )-Asn-Asn-Ile-Asn-Phe-Tyr-Tyr-Tyr-Thr CGT AAC AAT ATC AAC TTC TAC TAT TAC ACT

## 実施例 5

SV40 後期プロモーターを有する発現ベクター pSVL へのルシフェラーゼ cDNA の挿入

5 実施例 4 で得られたウミホタル由来のルシフェラーゼをコードする前記の 1.9 kb の *EcoRI* 断片 1  $\mu$ g に各々 1.5 mM の dATP, dTTP, dCTP 及び dGTP の存在下に、5 ユニットの大腸菌 DNA ポリメラーゼ I ラージ フラグメント (宝酒造社製) を作用させ、末端を修復した。また、ベクターの pSVL (SV40 後期プロモーターを持つ発現ベクター: ファルマシア社製) は、制限酵素 *SmaI* により分解した。

10 ついで末端を修復した 1.9 kb 断片 (0.3  $\mu$ g) と pSVL の *SmaI* 分解物 (0.1  $\mu$ g) とを T4 DNA リガーゼによって結合し、その反応液を用いて大腸菌 HB101 コンピテント細胞 (宝酒造社製) の形質転換を行い、この 1.9 kb 断片の組み込まれた組換え体プラスミドを得、pSVLCL5 と命名した (第 3 図)。

## 実施例 6

20 COS-1 細胞によるウミホタル由来のルシフェラーゼの生産

実施例 5 において作製した発現ベクター pSVLCL5 (10  $\mu$ g) を、COS-1 細胞に DEAE-デキストラン法 [Mol. Cell. Biol., 5, 118 (1985)] を用いて導入した。また、コントロー

25

ルとして pSVL (10  $\mu$ g) を同様にして COS-1 細胞に導入した。

これらの細胞を 25 cm<sup>2</sup> の培養フラスコ中で、10 % 牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地（日水製薬社製）10 ml を用いて 5 % CO<sub>2</sub> の存在下、  
5 37 °C で 5 日間培養した。培養途中及び培養終了後、培養液 1 ml を採取し、3,000 rpm、10 分間、4 °C で遠心して、その上清を集め、培養上清とした。

また、培養終了後、細胞はトリプシン処理によって培養フラスコからはがした後、1 ml の PBS (-)（日水製薬社製）で洗浄し、3,000 rpm、10 分間、  
10 4 °C で遠心し上清を捨てた。これをさらに 2 回繰り返し、200  $\mu$ l の PBS (-) に懸濁した。凍結融解を 3 回繰り返し、細胞抽出液とした。

#### 15 実施例 7

##### 動物細胞により生産されたルシフェラーゼの活性測定

実施例 6 に示した培養上清中のルシフェラーゼ活性の測定は、下記の方法によって行い、その結果を第 2 表に示した。すなわち、30  $\mu$ l の培養上清に 270  $\mu$ l の  
20 測定用緩衝液 [100 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0) / 200 mM 塩化ナトリウム] を混合した。2  $\mu$ l の 33  $\mu$ M ウミホタル・ルシフェリンを混合し、発生するフォトン数を直ちにルミノメーター (Lumac L 2010) を用いて 30 秒間計測した。発光強度は 1 秒  
25 当たりの平均フォトン数として示した。コントロールと

してpSVLを導入したCOS-1細胞の培養上清についても同様にして発生するフォトン数を計測した。

実施例6に示した細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性は、下記に記載した方法により行い、その結果も第2表に示した。すなわち実施例6で作製した細胞画分の10  $\mu$ lを290  $\mu$ lの上記測定用緩衝液と混合し、さらに2  $\mu$ lの33  $\mu$ Mウミホタル・ルシフェリンを混合し、培養上清の場合と同様にしてルシフェラーゼ活性を測定した。

10

第2表

15	プラスミド	ルシフェラーゼ活性 ( $\times 10^5$ cps/ml)					
		細胞外					細胞内
		24時間	48時間	72時間	96時間	120時間	120時間
15	(a) pSVLCL5 (No. 1)	2.2	4.0	4.3	4.6	5.2	1.2
	(b) pSVLCL5 (No. 2)	2.3	5.8	8.3	9.0	10.5	3.0
	(c) pSVLCL5 (No. 3)	2.1	3.1	3.8	4.1	5.5	0.8
20	(d) pSVLCL5 (No. 4)	2.3	4.0	5.5	5.7	6.7	1.4
	(e) pSVL (コントロール)	2.0	2.5	2.3	2.3	2.1	0.2

25

## 実施例 8

酵母発現ベクター用オリゴヌクレオチドの合成とアニーリング

- (1) ウミホタルより精製した天然型のルシフェラーゼが、第1図に示したアミノ酸配列の第31番目のアミノ酸であるセリンと第32番目のアミノ酸であるスレオニンのN末端を持つ2種類のペプチドの混合物であること、(2) cDNAより推定されるルシフェラーゼのアミノ酸配列のN末端に、タンパクの分泌のためのシグナル配列の特徴を持つアミノ酸配列が存在すること、
- (3) 多くの真核生物ではシグナル配列はアラニン-X-アラニン配列の次で切断されるが、ウミホタルのルシフェラーゼにおいてもアラニン-グルタミン酸-アラニン-プロリンの配列が存在すること等の理由により、第1図に示したウミホタル由来のルシフェラーゼのアミノ酸配列中の第29番目のアミノ酸であるプロリン(YP型)、第30番目のアミノ酸であるセリン(YN型)、第31番目のアミノ酸であるセリン(YS型)、第32番目のアミノ酸であるスレオニン(YT型)から始まるルシフェラーゼ・タンパクを作製し、酵母の $\alpha$ フェロモンのシグナル配列の下流に連結するために、以下の10本のオリゴヌクレオチドを合成した。

YP - 1    5'-CCTTCAAGTACTCCA-3'  
 YP - 2    5'-CTGTTGGAGTACTTGAAGG-3'  
 YS - 1    5'-AGTACACCA-3'  
 YS - 2    5'-CTGTTGGTGTACT-3'  
 5    YT - 1    5'-ACTCCA-3'  
      YT - 2    5'-CTGTTGGAGT-3'  
      YN - 1    5'-TCGTCGACACCA-3'  
      YN - 2    5'-CTGTTGGTGTGCGACGA-3'  
      U - 1    5'-ACAGTCCCAACATCTTGTGAAGCTAAAGAAGGAG  
 10            AATGTAT-3'  
      U - 2    5'-CGATACATTCTCCTTCTTTAGCTTCACAAGATGT  
              TGGGA-3'

15    合成オリゴヌクレオチドYP-2、YS-2、YT-  
      2、YN-2、U-2の5本については、5'末端をT  
      4 DNA キナーゼによってリン酸化した。すなわち、  
      各オリゴヌクレオチド300 pmolを各々20  $\mu$ lの  
      反応液[50 mM トリス塩酸(pH 7.6) / 10 mM  
 20    塩化マグネシウム / 0.1 mM スペルミジン / 5 mM  
      ジチオスレイトール / 0.1 mM EDTA]中でT4  
      DNA キナーゼ(宝酒造社製)10ユニットを用いて、  
      37°Cで1時間反応させ、70°Cで5分間加熱した後、  
      -20°Cで保存した。

25    各オリゴヌクレオチドのアニーリングは次のように行

った。YP型ではYP-1、リン酸化したYP-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、YS型にはYS-1、リン酸化したYS-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、YT型にはYT-1、リン酸化したYT-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、YN型にはYN-1、リン酸化したYN-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、各々50 pmolずつ混合し、70°Cで5分間加熱後、インキュベーターの電源を切り42°Cになるまで放置した。

#### 10 実施例9

酵母 $\alpha$ フェロモン遺伝子のプロモーターを有する発現ベクターpMF $\alpha$ 8へのルシフェラーゼcDNAの挿入

ウミホタル・ルシフェラーゼcDNA中に存在する制限酵素ClaI切断部位に実施例8に示した合成オリゴマーを組み込み、5'末端にStuI部位を持ち、N末端28、29、30、31個のアミノ酸を削ったルシフェラーゼcDNAを作製した。

酵母の発現ベクターpMF $\alpha$ 8 [Gene、3、155 (1985): ATCC 37418] は、 $\alpha$ フェロモン遺伝子のリーダー配列をコードする領域の直後を制限酵素StuIで切断し、上述のルシフェラーゼcDNAを挿入した。作製した発現ベクターは、各々pMEF3A (YP型)、pMEF3B (YS型)、pMEF3C (YT型)、pMEF3D (YN型) と命名した (第4a図)。



作製した各々の発現ベクターの $\alpha$ フェロモン遺伝子／  
ルシフェラーゼ cDNA の接続部位近傍の塩基配列は、  
ルシフェラーゼ cDNA 内の配列である 5' - T A T A  
A A T G G T C C A A G G A - 3' をプライマーとして、  
5 通常のジデオキシ法によって、正しく挿入されているこ  
とを確認した。pMFE3A、pMFE3B、pMFE  
3C、及びpMFE3Dにおける $\alpha$ フェロモン遺伝子／  
ルシフェラーゼ cDNA の接続部位近傍の塩基配列、及  
びアミノ酸配列は第4b図に示した。

#### 10 実施例10

酵母GAL1遺伝子のプロモーターを有する発現ベク  
ターp103へのルシフェラーゼ cDNA の挿入

実施例3で得た $\lambda$ CL07より、1.3kb、0.6  
kbの2つのEcoRI断片を各々プラスミドpUC1  
15 8にサブクローニングし、プラスミドpCL0712、  
pCL0742を作製した。pCL07 (1 $\mu$ g)、及  
びpCL0712 (1 $\mu$ g) をHindIIIとBglIIで  
切断し、pCL07よりルシフェラーゼのN末端を含む  
DNA断片を、pCL0712よりルシフェラーゼのC  
20 末端を含むDNA断片を精製した。この2断片をプラス  
ミドpSPT18 (ベーリンガー・マンハイム社製) の  
HindIII部位にサブクローニングし、得られた組換え  
体プラスミドをpSTCL81と命名した。

次に、このpSTCL81 (1 $\mu$ g) をBamHIで  
25 切断し、クローニングした全cDNA配列をBamHI

断片として回収した。

一方、酵母の *GAL1* プロモーターを持つ発現ベクター *p103* [*Saccharomyces cerevisiae* の *GAL1* プロモーター {*Mol. Cell. Biol.*、4、1440 (1984)} の下流に、*BamHI* 切断部位を含むポリリンカーを持つ：大阪大学・原島 俊 助教授より供与された] 約 0.1  $\mu$ g を *BamHI* で切断し、*T4 DNA* リガーゼを用いて前記の *cDNA* 断片約 0.1  $\mu$ g と連結し、*GAL1* プロモーターの下流にルシフェラーゼ *cDNA* の挿入された発現ベクター *pGL1* を作製した (第5図)。

#### 実施例 11

##### 酵母によるウミホタル由来のルシフェラーゼの生産

実施例 9 において作製した発現ベクター *pMFE3A*、*pMFE3B*、*pMFE3C*、*pMFE3D* 各々 10  $\mu$ g をプロトプラスト法 [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、75、1929 (1978)] によって酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 20B-12 株 [*Gene*、37、155 (1985)] 株に導入した。

これらの形質転換体を 1 l の培養フラスコ中で 100 ml の *YEPD* 培地を用いて 30 °C で 3 日間培養した。培養途中及び培養終了後、培養液 5 ml を採取し、4 °C、10 分間、3,000 rpm で遠心して、その上清を集め培養上清とした。

また培養液 1 ml 分の菌体は 5 ml の滅菌蒸留水で洗

5 浄後、1 ml の 50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.5) /  
0.1% Triton X-100 に懸濁した。1 ml  
のガラス・ビーズ (直径 0.45 mm) 懸濁液を加え、  
0°C で、時々ミキサーで激しく攪拌しながら 5 分間放置  
した。軽く遠心してガラス・ビーズを分離し、上清はさ  
らに 1.5 ml のエッペンドルフ チューブに移し、5  
分間、15,000 rpm で遠心した。この上清を菌体  
抽出液とした。

#### 実施例 12

10 酵母によるウミホタル由来のルシフェラーゼの生産  
実施例 10 で作製した発現ベクター pGL1 (10  $\mu$   
g) は、実施例 11 と同様にプロトプラスト法によって  
酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YSH2676 株 ((a) *ura3-52*  
*leu2-3 leu2-112 trp1 pho3 pho5 his1-29*) 株に導入し  
15 た。

この形質転換体を 1 l の培養フラスコ中で 100 ml  
の培地 (1% 酵母エキス / 2% ペプトン / 2% ガ  
ラクトース) を用いて 30°C で 2 日間培養した。培養途  
中及び培養終了後、培養液 5 ml を 3,000 rpm、  
20 10 分間、4°C で遠心して、その上清を集め、培養上清  
とした。

また、菌体抽出液も実施例 11 と同様にして調製した。

#### 実施例 13

25 酵母により生産されたルシフェラーゼの活性測定  
実施例 11 に示した培養上清中のルシフェラーゼ活性

の測定は、実施例7に記載した動物細胞の培養上清のルシフェラーゼ活性の測定と同様にして行い、その結果を第3表に示した。コントロールとして、pMF $\alpha$ 8を導入した*S. cerevisiae* 20B-12株の培養上清についても同様に発生するフォトン数を計測した。

実施例11に示した酵母細胞中のルシフェラーゼ活性は、下記に記載した方法により行い、その結果も第3表に示した。すなわち、実施例11で作製した細胞抽出液10 $\mu$ lを290 $\mu$ lの上記測定用緩衝液と混合し、さらに2 $\mu$ lの33 $\mu$ M ウミホタル・ルシフェリンを混合し、培養上清の場合と同様にしてルシフェラーゼ活性を測定した。

第3表

15	プラスミド		ルシフェラーゼ活性 ( $\times 10^5$ cps/ml)				
			12時間	21時間	38時間	47時間	64時間
20	(a) pMFE3A	菌体内	<0.01	<0.01	0.01	0.02	0.01
		菌体外	0.05	0.02	4.84	13.47	2.11
	(b) pMFE3B	菌体内	<0.01	<0.01	0.02	0.01	<0.01
		菌体外	0.06	0.20	6.22	2.73	1.02
	(c) pMFE3C	菌体内	<0.01	<0.01	0.02	0.01	0.01
25		菌体外	0.10	0.21	2.76	0.79	0.89
	(d) pMFE3D	菌体内	<0.01	<0.01	0.02	0.01	0.01
		菌体外	0.06	0.21	3.97	0.76	1.02
	(e) control	菌体内	<0.01	<0.01	<0.01	0.01	<0.01
		菌体外	0.06	0.04	0.05	0.06	0.11

## 実施例 1 4

酵母により生産されたルシフェラーゼの活性測定

実施例 1 2 に示した培養上清中のルシフェラーゼ活性の測定は、実施例 7 に記載した動物細胞の培養上清のルシフェラーゼ活性の測定と同様にして行い、その結果を第 4 表に示した。コントロールとして、p 1 0 3 を導入した *S. cerevisiae* YSH2676 株の培養上清についても同様にして発生するフォトン数を計測した。

実施例 1 2 に示した酵母細胞中のルシフェラーゼ活性は、実施例 1 3 と同様にして行い、その結果を第 4 表に示した。

第 4 表

			ルシフェラーゼ活性 ( $\times 10^5$ cps/ml)		
15	クローン No.		20時間	43時間	51時間
	(a) No. 1	菌体内 菌体外	0.06 0.53	0.07 7.28	0.07 7.71
20	(b) No. 2	菌体内 菌体外	0.04 0.44	0.06 3.04	0.07 3.49
	(c) No. 3	菌体内 菌体外	0.07 0.40	0.07 3.00	0.06 4.70
	(d) No. 4	菌体内 菌体外	0.05 0.92	0.10 5.89	0.09 6.27
	(e) No. 5	菌体内 菌体外	0.06 0.50	0.08 2.52	0.05 2.47
	(f) control	菌体内 菌体外	0.01 0.08	n.t. 0.13	n.t. 0.03

## 実施例 15

大腸菌発現ベクター用オリゴヌクレオチドの合成とア  
ニールング

5 大腸菌トリプトファン合成遺伝子 (t r p) オペロンのプロモーターとSD配列の下流にメチオニン-プロリン (EP型)、メチオニン-セリン (ES型)、メチオニン-スレオニン (ET型) で開始される該ルシフェラーゼの発現ベクターを作製するために、以下の6本のオリゴヌクレオチドを合成した。

10

EP - 1	5'-CGATGCCGTCAAGTACACCA-3'
EP - 2	5'-CTGTTGGTGTACTTGACGGCAT-3'
ES - 1	5'-CGATGAGTACACCA-3'
ES - 2	5'-CTGTTGGTGTACTCAT-3'
15 ET - 1	5'-CGATGACACCA-3'
ET - 2	5'-CTGTTGGTGTTCAT-3'

20

合成オリゴヌクレオチドEP-2、ES-2、ET-2、及び実施例8のU-2の各々300 pmolは、実施例8と同様にしてN末端をT4 DNA キナーゼを用いてリン酸化し、-20°Cで保存した。

25

各オリゴヌクレオチドは、EP型ではEP-1、リン酸化したEP-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、ES型にはES-1、リン酸化したES-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、ET型にはET-1、リン

酸化したET-2、U-1、及びリン酸化したU-2を各々50 pmolずつ混合し、実施例8と同様にしてアニーリングした。

#### 実施例16

#### 5 大腸菌trp プロモーターを有する発現ベクターpMT1へのルシフェラーゼcDNAの挿入

大腸菌トリプトファン オペロン (trp) のプロモーター及びSD配列を持つ発現ベクターpMT-1 [PKM6 (特開昭61-247387号) 由来] は、制限  
10 酵素SmaI、ClaIとPvuIIで切断した。

一方、実施例3で作製した発現ベクターpCLO7をSmaIとClaIで切断し、ClaIより下流のルシフェラーゼcDNAを含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により分離、精製した。

15 pMT-1の切断断片とpCLO7の精製断片の各々0.1 µgをT4 DNA リガーゼ (宝酒造社製) を用いて連結し、再び制限酵素SmaIで切断した後、市販の大腸菌HB101コンピテント細胞 (宝酒造社製) を形質転換し、プラスミドpMT-CLO7を作製した。  
20 このプラスミドは、trp プロモーター/SD配列の下流にClaI部位より下流のルシフェラーゼcDNAを持つ。

このpMT-CLO7を制限酵素ClaIで切断し、その0.1 µgと実施例15で作製した合成DNAの5  
25 µlとをT4 DNA リガーゼで連結し、trp プ

ロモーター／SD配列の下流に、メチオニン-プロリン（EP型）、メチオニン-セリン（ES型）、メチオニ-スレオニン（ET型）で開始される該ルシフェラーゼ遺伝子を持つ発現ベクターを作製した。作製したプラスミドは各々、pMT-CLP、pMT-CLS、及び  
5 pMT-CLTと命名した。

作製した各々の発現ベクターのSD配列／ルシフェラーゼの接続部位近傍の塩基配列は、ルシフェラーゼcDNA内の配列である5'-TATAAATGGTCCA  
10 AGGA-3'をプライマーとして、通常のジデオキシ法によって、正しく挿入されていることを確認した。

pMT-CLP、pMT-CLS、pMT-CLTの制限酵素地図と確認した塩基配列を第6図に示す。

#### 実施例 17

15 大腸菌によるウミホタル由来のルシフェラーゼの生産

実施例 16で作製した発現ベクターを用いて大腸菌HB101株を形質転換し、得られた形質転換体を5mlのL培地（アンピシリン：100mg/lを含む）で1晩、37℃で静置培養した。翌日培養液の1mlを採取  
20 し、50mlの合成培地〔2×M9-カザミノ酸培地（6g/l リン酸二水素カリウム／12g/l リン酸水素二ナトリウム／10g/l カザミノ酸／10g／l 塩化ナトリウム／1g／l 塩化アンモニウム／1mg／l 塩酸チアミン／250mg／l 硫酸マ  
25 グネシウム／1% グルコース／100mg／l アン



- ピシリン]に懸濁し、25℃で1晩振盪培養した。翌朝、培養液にIAA（最終濃度20mg/l）とグルコース（最終濃度1%）を加え、12.5%のアンモニア水でpHを7.5に調整して、25℃で3時間培養を続けた。
- 5 3時間後、IAA、グルコース、アンモニア水を同様に  
して加え、さらに3時間培養を続けた。培養終了後、培  
養液8mlを遠心して集菌し、菌体を0.5mlのTE  
緩衝液[10mMトリス塩酸(pH 8.0)/1mM EDT  
A]に懸濁した。42℃の温水とドライアイス・アセト  
ン液を用いて凍結融解を3回繰り返して溶菌後、10分  
10 間、10,000rpmで遠心し、その遠心上清を粗酵  
素液とした。

#### 実施例18

##### 大腸菌により生産されたルシフェラーゼの活性測定

- 15 実施例17で作製した粗酵素液中のルシフェラーゼ活  
性の測定は、下記に記載した方法によって行い、その結  
果を第5表に示した。すなわち、150μlの粗酵素液  
に150μlの前記測定用緩衝液、2μlの33μM  
ウミホタル・ルシフェリンを混合し、発生するフォトン  
20 数を30秒間計測し、その結果を第5表に示した。コン  
トロールとしてPMT-CLR（合成DNAが逆方向に  
挿入されたプラスミド）を導入した大腸菌HB101に  
についても同様にして発生するフォトン数を計測した。

第5表

プラスミド	ルシフェラーゼ活性 (cps)
(a) pMT-CLP	1200
(b) pMT-CLS	870
(c) pMT-CLT	540
(d) pMT-CLR (control)	200

## 産業上の利用可能性

ウミホタル由来のルシフェラーゼは非常に発光強度の強い発光系であり、抗体分子を本酵素と結合させてEIA（酵素抗体アッセイ法）に、また、DNA/RNA分子と本酵素とを結合させてDNAプローブ法に利用するなど、各種検査法への利用が期待できる。

本発明によって、ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードするcDNAの1次構造が特定され、同時に該ルシフェラーゼの1次構造が明らかになった。さらに、本発明にあるルシフェラーゼの発現ベクターを持つ動物細胞、酵母、大腸菌の大量培養により、該ルシフェラーゼを安定的に生産させる方法が開かれ、該ルシフェラーゼを安価で大量に得ることができるようになるものと期待

される。

また、プロテイン・エンジニアリングの手法を用いて、  
該ルシフェラーゼの安定性の増加、発光量子収率の改善、  
発光条件の改善、発光波長の変更等を行う方法が開かれ

5 た。

10

15

20

25

## 請 求 の 範 囲

- (1) 第1図に示す1番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- 5 (2) 第1図に示す29番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- (3) 第1図に示す30番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- 10 (4) 第1図に示す31番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- (5) 第1図に示す32番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- 15 (6) 請求の範囲第1～5項記載のルシフェラーゼまたはその同効物をコードする遺伝子。
- (7) 第1図に示す塩基配列である請求の範囲第6項記載の遺伝子。
- 20 (8) 宿主細胞中で発現可能なプロモーターの下流に請求の範囲第6項記載の遺伝子を連結してなる組換え体ベクターDNA。
- (9) 大腸菌中で発現可能なプロモーター及びSD配列の下流に請求の範囲第6項記載の遺伝子を連結して
- 25

なる組換え体ベクターDNA。

(10) 請求の範囲第8または9項記載のベクターDNAにより宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

5 (11) 宿主細胞が動物細胞、酵母及び大腸菌からなる群から選ばれた1種である請求の範囲第10項記載の形質転換体。

10 (12) 請求の範囲第10または11項記載の形質転換体を培養することを特徴とするルシフェラーゼの生産方法。

15

20

25

1/9

第1a図

Met	Lys	Leu	Ile	Ile	Leu	Ser	Ile	Ile	Leu	Ala	Tyr	Cys	Val	Thr	Val	Asn	Cys	Gln	Asp	20
ATG	AAG	CTA	ATA	ATT	CTG	TCT	ATT	ATA	TTG	GCC	TAC	TGT	GTC	ACA	GTC	AAC	TGC	CAG	GAT	30
	10				20				30				40			50			60	
																				40
Ala	Cys	Pro	Val	Glu	Ala	Glu	Ala	Pro	Ser	Ser	Thr	Pro	Thr	Val	Pro	Thr	Ser	Cys	Glu	50
GCA	TGT	CCT	GTA	GAA	GCT	GAA	GCA	CCG	TCA	AGT	ACA	CCA	ACA	GTC	CCA	ACA	TCT	TGT	GAA	60
	70				80				90			100			110				120	
																				40
Ala	Lys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ile	Asp	Thr	Arg	Cys	Ala	Thr	Cys	Lys	Arg	Asp	Ile	Leu	Ser	50
GCT	AAA	GAA	GGA	GAA	TGT	ATC	GAT	ACC	AGA	TGC	GCA	ACA	TGT	AAA	CGA	GAC	ATA	CTA	TCA	60
	130				140				150			160			170				180	
																				80
Asp	Gly	Leu	Cys	Glu	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Thr	Cys	Cys	Arg	Met	Cys	Gln	Tyr	Val	Ile	90
GAC	GGA	CTG	TGT	GAA	AAT	AAA	CCA	GGG	AAG	ACA	TGC	TGT	AGA	ATG	TGC	CAG	TAT	GTA	ATT	100
	190				200				210			220			230				240	
																				90
Glu	Cys	Arg	Val	Glu	Ala	Ala	Gly	Tyr	Phe	Arg	Thr	Phe	Tyr	Gly	Lys	Arg	Phe	Asn	Phe	100
GAA	TGC	AGA	GTA	GAA	GCT	GCT	GGA	TAT	TTT	AGA	ACG	TTT	TAC	GGC	AAA	AGA	TTT	AAT	TTT	110
	250				260				270			280			290				300	
																				120
Gln	Glu	Pro	Gly	Lys	Tyr	Val	Leu	Ala	Arg	Gly	Thr	Lys	Gly	Gly	Asp	Trp	Ser	Val	Thr	130
CAG	GAA	CCT	GGT	AAA	TAT	GTG	CTG	GCT	CGA	GGA	ACC	AAG	GGT	GGC	GAC	TGG	TCT	GTA	ACC	140
	310				320				330			340			350				360	
																				130
Leu	Thr	Met	Glu	Asn	Leu	Asp	Gly	Gln	Lys	Gly	Ala	Val	Leu	Thr	Lys	Thr	Thr	Leu	Glu	140
CTC	ACC	ATG	GAG	AAT	CTA	GAT	GGA	CAG	AAG	GGA	GCT	GTA	CTG	ACT	AAG	ACA	ACA	CTG	GAG	150
	370				380				390			400			410				420	
																				150
Val	Val	Gly	Asp	Val	Ile	Asp	Ile	Thr	Gln	Ala	Thr	Ala	Asp	Pro	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	160
GTA	GTA	GGA	GAC	GTA	ATA	GAC	ATT	ACT	CAA	GCT	ACT	GCA	GAT	CCT	ATC	ACA	GTT	AAC	GGA	170
	430				440				450			460			470				480	

2/9

## 第1b図

										170											180																																												
Gly	Ala	Asp	Pro	Val	Ile	Ala	Asn	Pro	Phe	Thr	Ile	Gly	Glu	Val	Thr	Ile	Ala	Val	Val																																														
GGA	GCT	GAC	CCA	GTT	ATC	GCT	AAC	CCG	TTC	ACA	ATT	GGT	GAG	GTG	ACC	ATT	GCT	GTT	GTC																																														
										490											500											510											520											530											540
										190											200																																												
Glu	Ile	Pro	Gly	Phe	Asn	Ile	Thr	Val	Ile	Glu	Phe	Phe	Lys	Leu	Ile	Val	Ile	Asp	Ile																																														
GAA	ATA	CCC	GGC	TTC	AAT	ATT	ACA	GTC	ATC	GAA	TTC	TTT	AAA	CTA	ATC	GTG	ATT	GAT	ATT																																														
										550											560											570											580											590											600
										210											220																																												
Leu	Gly	Gly	Arg	Ser	Val	Arg	Ile	Ala	Pro	Asp	Thr	Ala	Asn	Lys	Gly	Leu	Ile	Ser	Gly																																														
CTG	GGA	GGA	AGA	TCT	GTG	AGA	ATT	GCT	CCA	GAC	ACA	GCA	AAC	AAA	GGA	CTG	ATA	TCT	GGT																																														
										610											620											630											640											650											660
										230											240																																												
Ile	Cys	Gly	Asn	Leu	Glu	Met	Asn	Asp	Ala	Asp	Asp	Phe	Thr	Thr	Asp	Ala	Asp	Gln	Leu																																														
ATC	TGT	GGT	AAT	CTG	GAG	ATG	AAT	GAC	GCT	GAT	GAC	TTT	ACT	ACA	GAC	GCA	GAT	CAG	CTG																																														
										670											680											690											700											710											720
										250											260																																												
Ala	Ile	Gln	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Glu	Phe	Asp	Gly	Cys	Pro	Phe	Tyr	Gly	Asn	Pro	Ser																																														
GCG	ATC	CAA	CCC	AAC	ATA	AAC	AAA	GAG	TTC	GAC	GGC	TGC	CCA	TTC	TAC	GGG	AAT	CCT	TCT																																														
										730											740											750											760											770											780
										270											280																																												
Asp	Ile	Glu	Tyr	Cys	Lys	Gly	Leu	Met	Glu	Pro	Tyr	Arg	Ala	Val	Cys	Arg	Asn	Asn	Ile																																														
GAT	ATC	GAA	TAC	TGC	AAA	GGT	CTC	ATG	GAG	CCA	TAC	AGA	GCT	GTA	TGT	CGT	AAC	AAT	ATC																																														
										790											800											810											820											830											840
										290											300																																												
Asn	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ala	Tyr	Cys	Met	Gly	Gly	Glu	Glu	Arg																																														
AAC	TTC	TAC	TAT	TAC	ACT	CTG	TCC	TGC	GCC	TTC	GCT	TAC	TGT	ATG	GGA	GGA	GAA	GAA	AGA																																														
										850											860											870											880											890											900
										310											320																																												
Ala	Lys	His	Val	Leu	Phe	Asp	Tyr	Val	Glu	Thr	Cys	Ala	Ala	Pro	Glu	Thr	Arg	Gly	Thr																																														
GCT	AAA	CAC	GTC	CTT	TTC	GAC	TAT	GTT	GAG	ACA	TGC	GCT	GCA	CCG	GAA	ACG	AGA	GGA	ACG																																														
										910											920											930											940											950											960

3/9

## 第1 c 図

															330																340										
Cys	Val	Leu	Ser	Gly	His	Thr	Phe	Tyr	Asp	Thr	Phe	Asp	Lys	Ala	Arg	Tyr	Gln	Phe	Gln																						
TGT	GTT	TTA	TCA	GGA	CAT	ACT	TTC	TAT	GAC	ACA	TTC	GAC	AAA	GCC	AGA	TAT	CAA	ITC	CAG																						
					970						980						990						1000						1010						1020						
																				350																					360
Gly	Pro	Cys	Lys	Glu	Leu	Leu	Met	Ala	Ala	Asp	Cys	Tyr	Trp	Asn	Thr	Trp	Asp	Val	Lys																						
GGC	CCA	TGC	AAA	GAG	CTT	CTG	ATG	GCC	GCA	GAC	TGT	TAC	TGG	AAC	ACA	TGG	GAT	GTA	AAG																						
					1030						1040						1050						1060						1070						1080						
																				370																					380
Val	Ser	His	Arg	Asp	Val	Glu	Ser	Tyr	Thr	Glu	Val	Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Arg	Lys	Gln																						
GTT	TCA	CAT	AGA	GAT	GTT	GAG	TCA	TAC	ACT	GAG	GTA	GAG	AAA	GTA	ACA	ATC	AGG	AAA	CAG																						
					1090						1100						1110						1120						1130						1140						
																				390																					400
Ser	Thr	Val	Val	Asp	Leu	Ile	Val	Asp	Gly	Lys	Gln	Val	Lys	Val	Gly	Gly	Val	Asp	Val																						
TCA	ACT	GTA	GTA	GAT	TTG	ATT	GTG	GAT	GGC	AAG	CAG	GTC	AAG	GTT	GGA	GGA	GTG	GAT	GTA																						
					1150						1160						1170						1180						1190						1200						
																				410																					420
Ser	Ile	Pro	Tyr	Ser	Ser	Glu	Asn	Thr	Ser	Ile	Tyr	Trp	Gln	Asp	Gly	Asp	Ile	Leu	Thr																						
TCT	ATC	CCG	TAC	AGT	TCT	GAG	AAC	ACA	TCC	ATA	TAC	TGG	CAG	GAT	GGA	GAC	ATC	CTG	ACG																						
					1210						1220						1230						1240						1250						1260						
																				430																					440
Thr	Ala	Ile	Leu	Pro	Glu	Ala	Leu	Val	Val	Lys	Phe	Asn	Phe	Lys	Gln	Leu	Leu	Val	Val																						
ACG	GCC	ATC	CTA	CCT	GAA	GCT	CTT	GTG	GTT	AAG	TTC	AAC	TTT	AAG	CAG	CTC	CTT	GTA	GTT																						
					1270						1280						1290						1300						1310						1320						
																				450																					460
His	Ile	Arg	Asp	Pro	Phe	Asp	Gly	Lys	Thr	Cys	Gly	Ile	Cys	Gly	Asn	Tyr	Asn	Gln	Asp																						
CAT	ATC	AGA	GAT	CCA	TTC	GAT	GGA	AAG	ACA	TGC	GCC	ATA	TGT	GGT	AAC	TAT	AAT	CAA	GAT																						
					1330						1340						1350						1360						1370						1380						
																				470																					480
Ser	Thr	Asp	Asp	Phe	Phe	Asp	Ala	Glu	Gly	Ala	Cys	Ala	Leu	Thr	Pro	Asn	Pro	Pro	Gly																						
TCA	ACT	GAT	GAT	TTC	TTT	GAC	GCA	GAA	GGA	GCA	TGC	GCT	CTG	ACC	CCC	AAT	CCC	CCA	GGA																						
					1390						1400						1410						1420						1430						1440						



4/9

## 第1 d 図

490 500  
 Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Ser Leu Phe Asp Ser Ser  
 TGT ACA GAG GAG CAG AAA CCA GAA GCT GAG CGA CTC TGC AAT AGT CTA TTT GAT AGT TCT  
 1450 1460 1470 1480 1490 1500

510 520  
 Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu  
 ATC GAC GAG AAA TGT AAT GTC TGC TAC AAG CCT GAC CGT ATT GCA CGA TGT ATG TAC GAG  
 1510 1520 1530 1540 1550 1560

530 540  
 Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys  
 TAT TGC CTG AGG GGA CAG CAA GGA TTC TGT GAC CAT GCT TGG GAG TTC AAA AAA GAA TGC  
 1570 1580 1590 1600 1610 1620

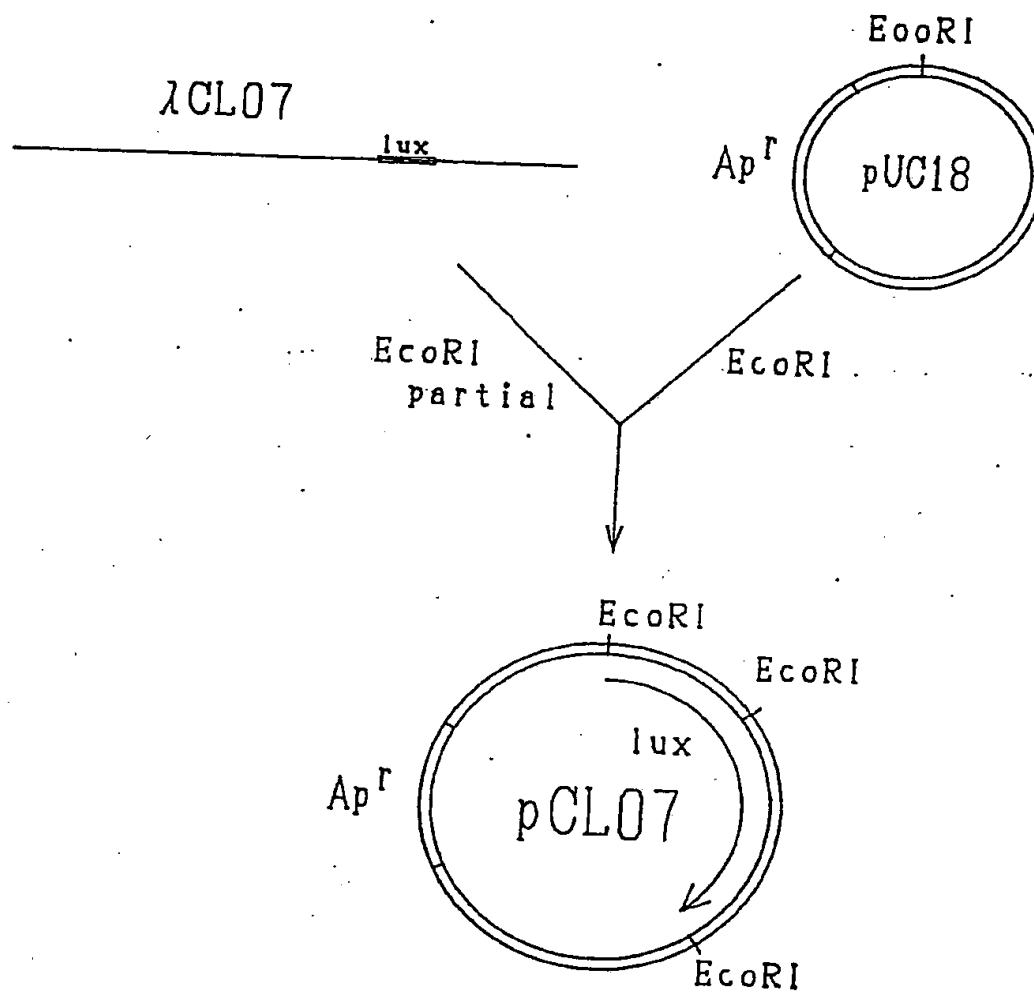
550 555  
 Tyr Ile Lys His Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln \*\*\*  
 TAC ATA AAG CAT GGA GAC ACT CTA GAA GTA CCA CCT GAA TGC CAA TAAATGAACAAAGATACAG  
 1630 1640 1650 1660 1670 1680

AAGCTAAGACTACTACAGCAGAAGATAAAAGAGAAGCTGTAGTTCTTCAAAAACAGTATATTTTGATGTACTCATTGTT  
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760

1770 1780 1790 1800 1810 1820  
 TACTTACATAAAAATAAATTGTTATTATCATAACGTAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

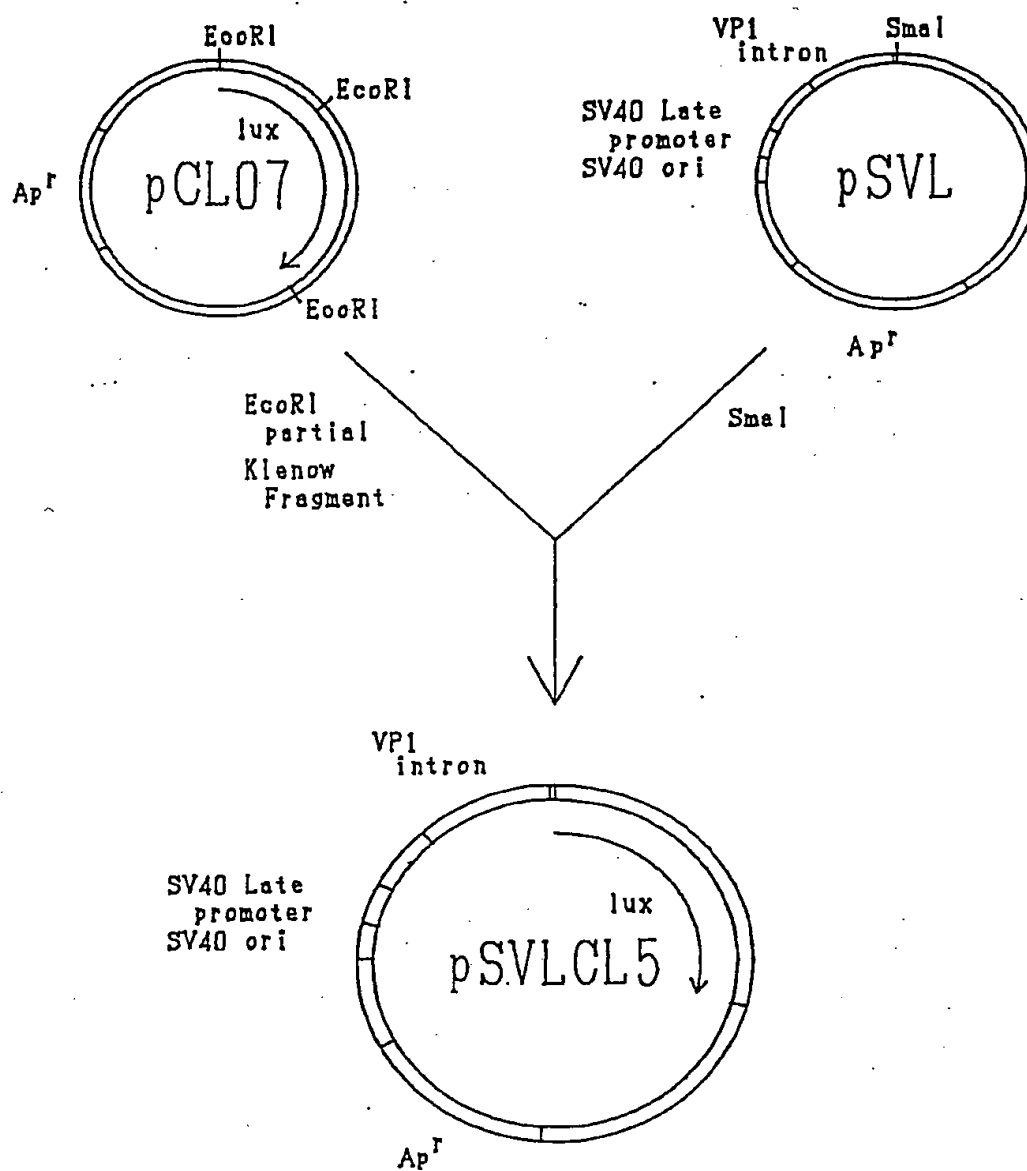
5/9

第2図



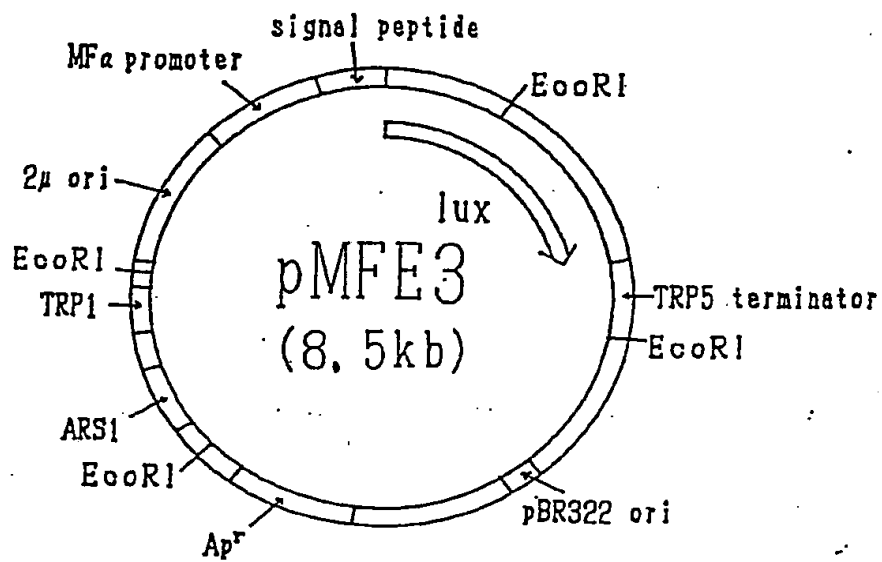
6/9

第3図



7/9

第4a図

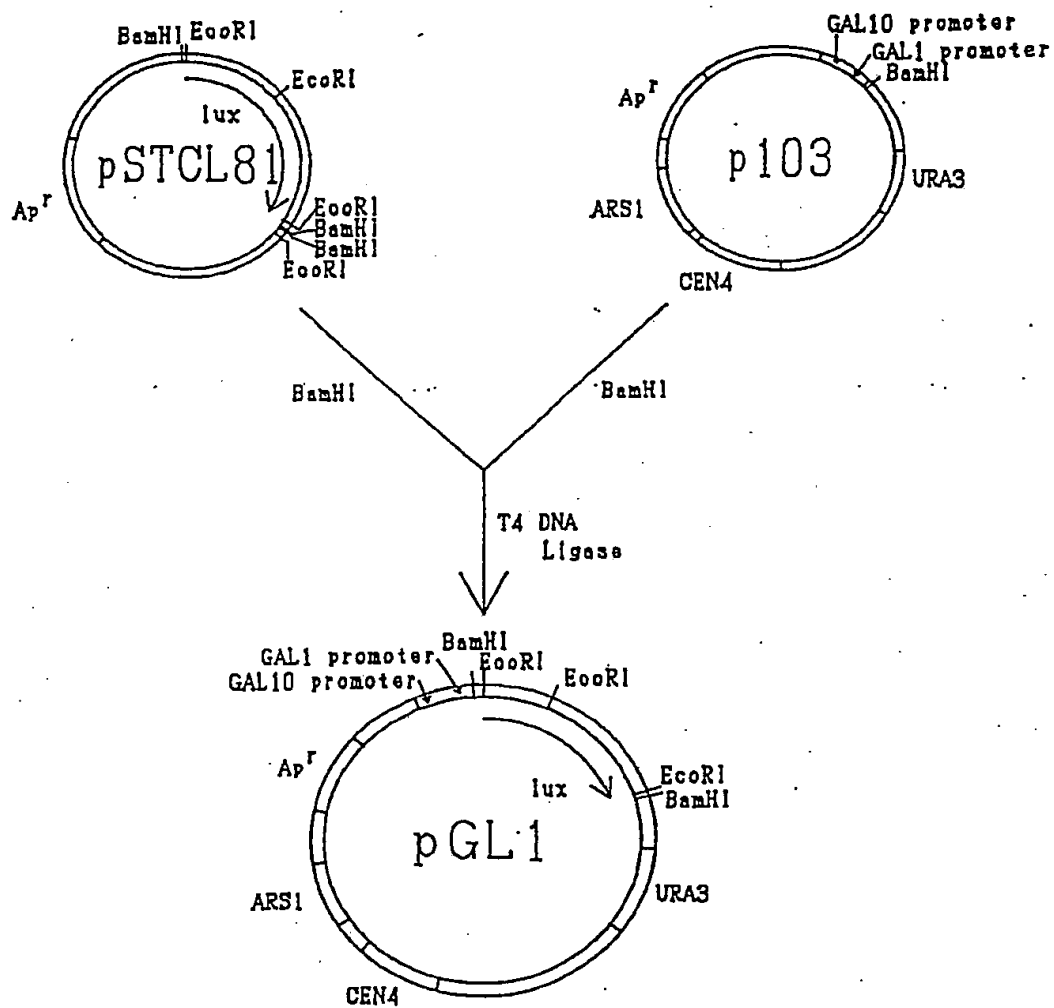


第4b図

				29	30	31	32	33	
(a) pMFE3A	Met.....Lys	Arg	Pro	Ser	Ser	Thr	Pro	...	
(b) pMFE3B	Met.....Lys	Arg	---	---	Ser	Thr	Pro	...	
(c) pMFE3C	Met.....Lys	Arg	---	---	---	Thr	Pro	...	
(d) pMFE3D	Met.....Lys	Arg	---	Ser	Ser	Thr	Pro	...	

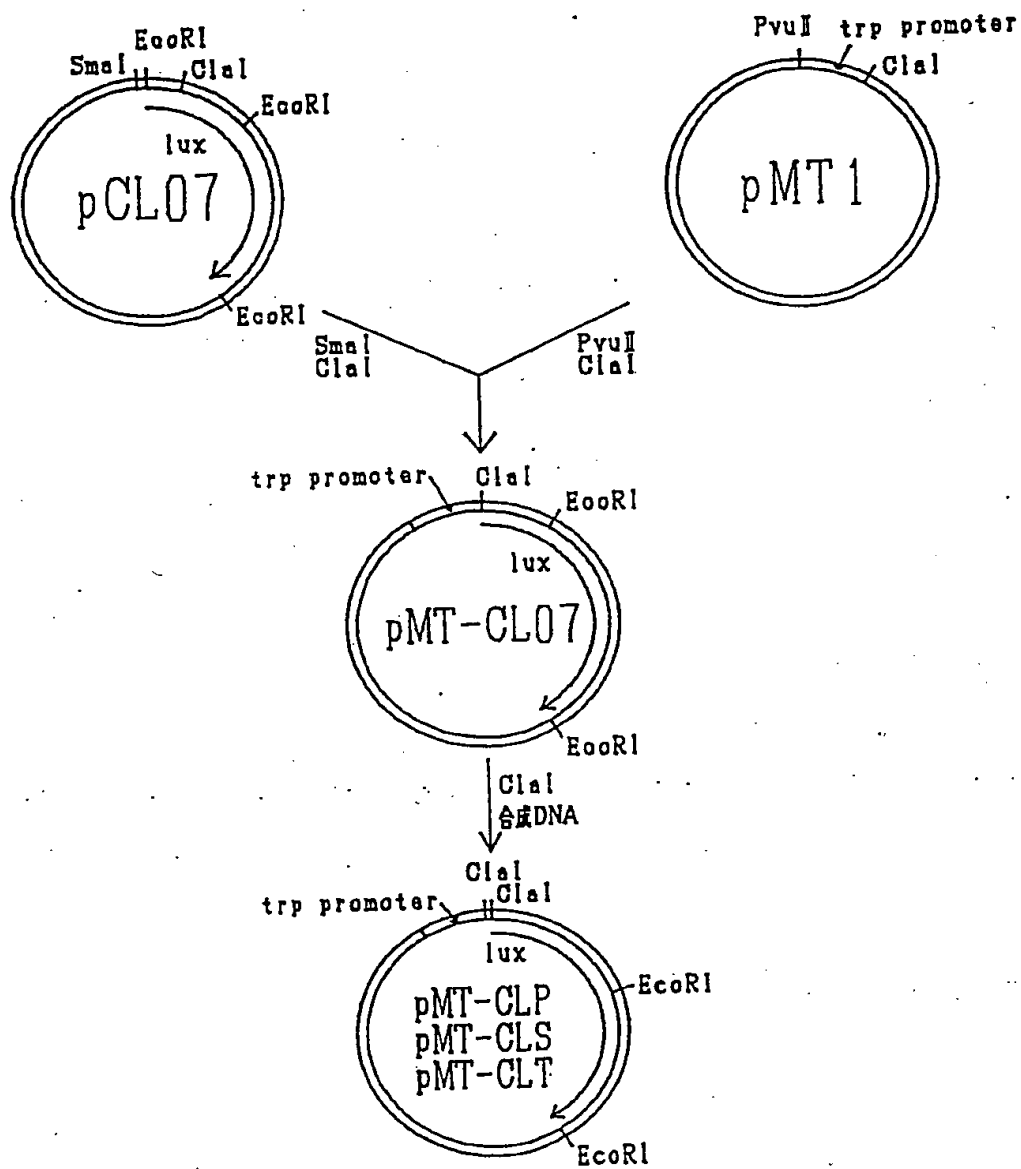
8/9

## 第5図



9/9

第6図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP89/00811

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) * According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">             Int. Cl<sup>4</sup>      C12N9/02, C12N15/00         </div>														
<b>II. FIELDS SEARCHED</b> <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">Minimum Documentation Searched <sup>7</sup></div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 25%;">Classification System</th> <th style="width: 75%;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">IPC</td> <td style="text-align: center; padding: 10px;">C12N9/02, C12N15/00</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup></div>			Classification System	Classification Symbols	IPC	C12N9/02, C12N15/00								
Classification System	Classification Symbols													
IPC	C12N9/02, C12N15/00													
<b>COMPUTER SEARCH (CHEMICAL ABSTRACTS, BIOSIS DATABASES, EMBL-GDB, LASL-GDB AND NBRF-PDB)</b>														
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%;">Category <sup>9</sup></th> <th style="width: 60%;">Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup></th> <th style="width: 30%;">Relevant to Claim No. <sup>13</sup></th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X, Y</td> <td style="padding: 5px;">BIOCHEMISTRY, Vol. 13, No. 25, (1974), F.I.Tsuji, et al [Some Properties of Luciferase from the Bioluminescent Crustacean, Cypridina hi/gendorffii] P. 5204 - 5209</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1 - 5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">SCIENCE, Vol. 234, No. 4778, (1986), D.W.Ow, et al [Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants] P. 856 - 859</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">6 - 12</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">WO, A1, 88/00617 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH, INC.) 28 January 1988 (28. 01. 88)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">6 - 12</td> </tr> </table>			Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>	X, Y	BIOCHEMISTRY, Vol. 13, No. 25, (1974), F.I.Tsuji, et al [Some Properties of Luciferase from the Bioluminescent Crustacean, Cypridina hi/gendorffii] P. 5204 - 5209	1 - 5	A	SCIENCE, Vol. 234, No. 4778, (1986), D.W.Ow, et al [Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants] P. 856 - 859	6 - 12	A	WO, A1, 88/00617 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH, INC.) 28 January 1988 (28. 01. 88)	6 - 12
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>												
X, Y	BIOCHEMISTRY, Vol. 13, No. 25, (1974), F.I.Tsuji, et al [Some Properties of Luciferase from the Bioluminescent Crustacean, Cypridina hi/gendorffii] P. 5204 - 5209	1 - 5												
A	SCIENCE, Vol. 234, No. 4778, (1986), D.W.Ow, et al [Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants] P. 856 - 859	6 - 12												
A	WO, A1, 88/00617 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH, INC.) 28 January 1988 (28. 01. 88)	6 - 12												
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p> </div> </div>														
<b>IV. CERTIFICATION</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">                 Date of the Actual Completion of the International Search                  September 18, 1989 (18. 09. 89)             </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">                 Date of Mailing of this International Search Report                  October 2, 1989 (02. 10. 89)             </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">                 International Searching Authority                  Japanese Patent Office             </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">                 Signature of Authorized Officer             </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search September 18, 1989 (18. 09. 89)	Date of Mailing of this International Search Report October 2, 1989 (02. 10. 89)	International Searching Authority Japanese Patent Office	Signature of Authorized Officer								
Date of the Actual Completion of the International Search September 18, 1989 (18. 09. 89)	Date of Mailing of this International Search Report October 2, 1989 (02. 10. 89)													
International Searching Authority Japanese Patent Office	Signature of Authorized Officer													

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C12N9/02, C12N15/00		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C12N9/02, C12N15/00	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
COMPUTER SEARCH (CHEMICAL ABSTRACTS, BIOSIS DATABASES, EMBL-GDB, LASL-GDB AND NBRF-PDB)		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X, Y	BIOCHEMISTRY, 第13巻, 第25号, (1974), F.I. Tsuji, et al [Some Properties of Luciferase from the Bioluminescent Crustacean, Cypridina hi/gendorffii] P.5204-5209	1-5
A	SCIENCE, 第234巻, 第4778号, (1986), D.W. Ow, et al [Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants] P.856-859	6-12
A	WO, A1, 88/00617 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH, INC.) 28. 1月. 1988 (28. 01. 88)	6-12
<p>※ 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
18. 09. 89	02. 10. 89	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 7 8 2 3
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官 平 田 和 男	